

REMARKS

Claims 11 and 13-18 are all the claims pending in the application. Claims 16 and 17 are amended herein for editorial purposes. Claim 18 is added as a new claim. Support is found, for example, at page 10, lines 15-22. No new matter is presented.

I. Response to Rejection under 35 U.S.C. § 102

Claims 11 and 13-17 remain rejected under 35 U.S.C. § 102(b) as being anticipated by Kammer (PTO-1449, 6/24/05).

Applicants respectfully traverse the rejection based on the following.

The Present Invention

As described in the specification, the present invention relates to a method for inhibiting articular cartilage extracellular matrix (ACEM) degradation, comprising an HDAC-inhibiting compound as an active ingredient. It is used particularly in a preventive or treating agent for arthroseitis, rheumatic arthritis and osteoarthritis in which articular cartilage matrix degradation and denaturation are present and is different from a method for prevention or treatment of arthroseitis, rheumatic arthritis, osteoarthritis, etc., comprising administering an HDAC-inhibiting compound as an effective ingredient.

The present invention also relates to a method for treatment of articular cartilage extracellular matrix degradation in arthroseitis, rheumatic arthritis or osteoarthritis containing an HDAC compound as an effective ingredient and is also different from a method for prevention or treatment of arthroseitis, rheumatic arthritis or osteoarthritis comprising administering an HDAC-inhibiting compound as an effective ingredient.

The present invention also relates to a method for treating osteoarthritis caused by articular cartilage extracellular matrix degradation, which comprises administering a therapeutically effective amount of a histone deacetylase-inhibiting compound to a patient in need thereof.

Rheumatic arthritis (in the General Meeting of the Japanese Rheumatic Society in 2002, the Japanese terminology has been changed from a Japanese term which may be literally translated into "chronic rheumatic arthritis" to a Japanese term which may be literally translated into "rheumatic arthritis") is a systemic inflammatory disease for which the etiology is still unknown and has been said to have a component of an autoimmune disease as well (refer to page 48 of Reference Document 1 and partial English translation thereof previously submitted with the Response filed November 27, 2006).

With regard to the cause for rheumatic arthritis, the autoimmune and the inflammatory causes have been said to be difficult to separate. Specific hypotheses therefore, include (1) a hypothesis where T cells are the cause and (2) a hypothesis where mesenchymal cells such as synovial cells are the cause (refer to page 48 of Reference Document 1 and partial English translation thereof previously submitted with the Response filed November 27, 2006). In the early stage of rheumatic arthritis, a mechanism in which T cells participate (hypothesis 1) is important, while, in the rheumatic synovial membrane of the progressed later stage, a process (hypothesis 2) that is no longer dependent upon T cells is predominant (refer to pages 51 to 52 of Reference Document 1 and partial English translation thereof previously submitted with the Response filed November 27, 2006). Thus, in the initial stage of rheumatic arthritis, various antigen-specific immune responses and activation of T cells are noted in the synovial membrane and they participate in growth of the synovial membrane, angiogenesis and lymphocyte

permeation. On the other hand, at the stage where rheumatic arthritis progresses, even when the antigen-specific activation of T cells has settled down, the semi-autonomic growth of synovial cells continues and the grown synovial cells secrete substances such as protease. It is considered that, as a result, the protease, etc., result in destruction of cartilage and bone (constituted from cartilage cells and extracellular matrix) (refer to pages 51 to 52 of Reference Document 1 and partial English translation thereof previously submitted with the Response filed November 27, 2006). As such, the etiology for rheumatic arthritis changes at each stage. Accordingly, even when attempts are made to treat rheumatic arthritis by a means that suppresses the autoimmune action (various antigen-specific immune responses, activation of T cells, etc.), these attempts are merely able to control the induction of the onset of rheumatic arthritis. Thus, this treatment does not inhibit the degradation of extracellular matrix which is a morbid state of rheumatic arthritis in the progressed later stage and does not prevent the destruction itself of cartilage and bone.

As in the case of rheumatic arthritis, osteoarthritis is a disease where degradation of extracellular matrix constituted from collagen and proteoglycan occurs. However, as is apparent from the description of classification of autoimmune diseases (refer to Table 2-2, page 29 of Reference Document 3 and partial English translation thereof previously submitted with the Response filed November 27, 2006) and its mechanism of action (refer to Fig. 4, page 32 of Reference Document 4 previously submitted with the Response filed November 27, 2006), osteoarthritis is not an autoimmune disease.

Thus, even though in concept both rheumatic arthritis and osteoarthritis are diseases where degradation of extracellular matrix constituted from collagen and proteoglycan occurs, the etiology of arthritis actually varies. If arthritis is characterized by reference to rheumatic arthritis, arthritis may be said to be a partially autoimmune disease.

Kammer

Kammer teaches that an HDAC inhibitor exhibits an effect whereby the expression of abnormal immune-related genes (CD 154, IL-10 and INF- γ) in T cells of patients suffering from systemic erythematosis is changed to a normal state, whereby the HDAC inhibitor is able to be used for treatment of many autoimmune diseases, including rheumatic arthritis. Kammer, also states that “[t]he autoimmune diseases of the present invention are not limited to rheumatic arthritis, Sjogren’s syndrome, multiple myositis, fungous skin disease and systemic erythematosis” (refer to line 7, page 6). Therefore, Kammer implies that the autoimmune diseases include a broad range of diseases from systemic diseases to local ones. In actuality, however, Kammer merely shows an improvement in proteinuria (kidney) by controlling a part of the autoimmune action mechanism (to be more specific, CD 154, IL-10 and INF- γ) and there is no disclosure of a specific effect on rheumatic arthritis (joint) therein. Even if a method for inhibition of HDAC is useful for proteinuria by controlling part of the autoimmune action mechanism, it is difficult to conclude that an HDAC inhibitor is useful for all autoimmune diseases including rheumatic arthritis from the above description for proteinuria because rheumatic arthritis is different from proteinuria in terms of disease and diseased site. Also, even if an HDAC inhibitor is able to control a part of the autoimmune action mechanism in rheumatic arthritis, this only means that an HDAC inhibitor is able to control a part of what triggers the onset of rheumatic arthritis to some extent. In terms of the target in the treatment of rheumatic arthritis this is different from improvement of degradation of extracellular matrix which is the final morbid state of rheumatic arthritis. Therefore, the present invention is different from the invention of Kammer in its target. Accordingly, the invention of Kammer does not necessarily

result in treating articular cartilage extracellular matrix degradation. Thus, the present invention is not inherent in Kammer.

On the other hand, according to the reference Ishiguro (submitted with the IDS filed June 24, 2005) there is a description that “articular rheumatism (RA) has been thought to appear with a background of immunopathy. . . . During the process starting from immunopathy until articular degradation, it is said a lot of substances and reaction steps are participated therein and many of them have been left unsolved. . . . In recent years, many facts have been clarified for a group of enzymes concerning thereto, i.e., matrix metalloproteases (MMPs) and their application to the treatment are under investigation” (page 81). Thus, it is disclosed that, although immunopathy is involved in its onset, MMPs are involved in the process until articular degradation.

In the Reference Document 1 (previously submitted with the Response filed November 27, 2006), it is described that there is a theory that mesenchymal cells such as synovial cells are the cause of RA and also a theory that T cells are the cause of RA (page 48). It is also described that in the progressed RA synovium in the later stage, the process which is independent on T cells is dominant (page 52).

At page 19 of the document submitted as Reference Document 5 (Saishin zgaku, 56(4), 2001, pages 15 to 23) (English translation of the description at lines 16 to 30, right column, of page 19 of this reference is below), a pathological process of RA is mentioned and it is disclosed that articular degradation proceeds according to three stages comprising: a first stage which is the initiation of immunoresponse; a second stage which is the development of chronic inflammation; and a third stage consisting of (1) protease released

from inflammatory synovium, (2) pannus which is an extension of inflammatory granulation tissue and (3) digestion from an inner area of cartilage matrix activated by inflammatory synovium. With regard to the third stage where ACEM degradation takes place, it is understood that inflammatory synovium plays an important role.

(Translation of the passage at lines 16-30 on page 19 of *Saishun Igaku*, 56(4), 2001, pp. 15 to 23]

1. Process of lesion of RA

Although the cause for RA is unknown, there is a consensus in general about onset of lesion and about the manner of its progress. Process of lesion of RA may be divided into three stages (Fig. 7). In the first stage, pathogenic factor reaches the arthritic synovium from blood and an immune response starts topically. In the second stage, macrophages, lymphocytes, neutrophils, etc. are liberated from blood and chronic inflammation develops (clinically, tumidity of joint is resulted). In the third stage, joint degradation proceeds due to the three processes of (1) protease released from inflammatory synovium, (2) pannus which is an extension of inflammatory granulation tissue or (3) digestion from inner area of cartilage matrix activated by inflammatory synovium (clinically, deformation of joints is resulted).

In Huber (submitted with the IDS filed November 30, 2006), it is disclosed that “the notion that RA is a primarily a T cell-dependent disease has been strongly challenged during recent years. Rather, it has been understood that resident, fibroblast-like cells contribute significantly to the perpetuation of the disease, and that they may even play a role in its initiation”. This means that, in recent years, RA has been found to be a disease where rheumatoid arthritis synovial fibroblasts (RASFs) play an important role rather than a disease dependent on T cells (page 669, Abstract).

Under the technical level where the findings shown in the above mentioned references 1 and 3 to 5 are available, the disclosure of Kammer reading that HDAC inhibitors are useful for the treatment of diseases in which T cells are involved do not motivate the persons skilled in the art to use the HDAC inhibitors for patients suffering from the final stage of RA (according to the above-mentioned Reference Document 3, which states that the process which is independent on T cells is thought to be dominant) where degradation of ACEM is a problem with an object of the treatment where normalization of T cells is a mechanism. It might be expected at most that the inhibitors might be used with an object of suppressing onset in the initial stage where participation of T cells is suggested.

On the other hand, the present application relates to i) a method for inhibiting ACEM degradation, ii) a method of treating ACEM degradation in arthroseitis, RA or OA, and iii) a method of treating arthroseitis or OA, caused by ACEM degradation and the patients where treatment of ACEM degradation is necessary are the objects.

Thus, the patient population of Kammer is sufficiently distinguished from the instant patient population and Kammer can not be said to anticipate the present invention. Similarly new claim 18 is patentable.

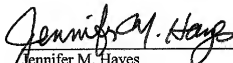
Accordingly, Applicants respectfully request withdrawal of the § 102 rejection.

II. Conclusion

In view of the above, reconsideration and allowance of this application are now believed to be in order, and such actions are hereby solicited. If any points remain in issue which the Examiner feels may be best resolved through a personal or telephone interview, the Examiner is kindly requested to contact the undersigned at the telephone number listed below.

The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account.

Respectfully submitted,


Jennifer M. Hayes
Registration No. 40,641

SUGHRUE MION, PLLC
Telephone: (202) 293-7060
Facsimile: (202) 293-7860

WASHINGTON DC SUGHRUE/265550

65565

CUSTOMER NUMBER

Date: September 4, 2007

最新医学

2001 4

SAISHIN IGAKU

最新医学社

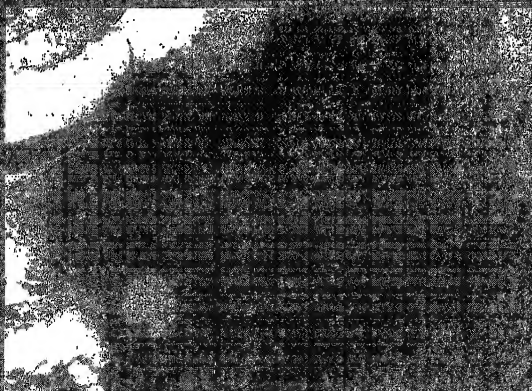
第56巻/第4号 (通巻第683号)

特集

慢性関節リウマチ

—遺伝子異常とその修復—

エッセー/対談/トピックス/症例



1085693

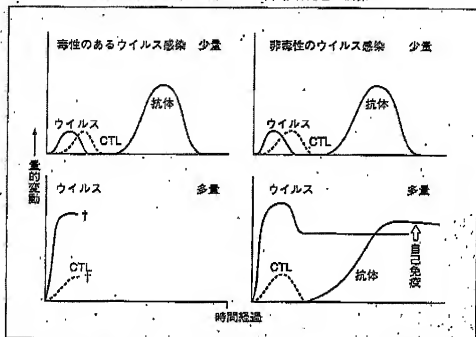
山之内製薬株式会社

(2001, 4)

特 集：慢性関節リウマチ—遺伝子異常とその修復—

15 (835)

図2 ウイルス感染と細胞傷害性T細胞 (CTL)、抗体応答の関係



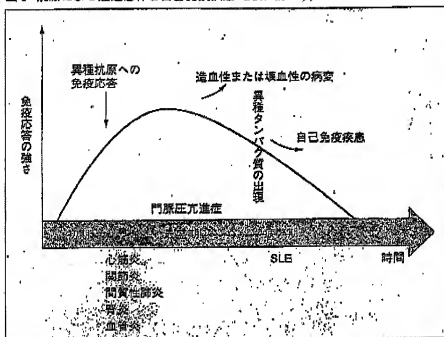
ベルでの突然変異と、② これを選択する自然淘汰の圧力（フィルター）によって構成され、優性の変異は子孫を残すことによって固定される。抗生物質のなかった時代には、感染を排除できる強い応答機構を備えた個体が淘汰され、人類は世代を語るごとに感染症に強くなっていったと考えられる。子孫を残すことが進化の原動力であるから、生殖年齢に達するまで健在であることが必要条件となり、したがって現代に生きる女性の免疫力は男子より強い。このように感染に対して強い防御応答が起きると、身体が防御の戦場となり炎症とサイトカインによって自身が焼き尽くされるから、強力な防御応答を示す個体は強い反応のゆえに消耗して生き残れず自然淘汰される。このため生命は、抗原に凌駕されずしかも抗原を殲滅しない程度にほどの応答を示して、生き残る道を選ぶことになると思われる。

ウイルスが体内に侵入した場合（図2）、少量であれば、ウイルスに毒性があるう

かりが、細胞傷害性T細胞（CTL）がこれに作用して、ウイルスの増殖は阻止され疾病は治癒する。ウイルスが大量でしかも毒性の場合、CTLが発動されても個体は途中で死ぬ。ところが非毒性ウイルスが多量に侵入すれば、CTLに攻撃されてウイルス量は減少しても、ウイルス量に比してCTLが足りないから、ウイルスがCTLのバリアを越えて侵入し続けることになる。すなわち、侵入抗原が生体にとって致死的でない場合、同一抗原が個体に持続的に供給され続けて遅延感作が成立し、遅延感作の結果自己免疫が起きてくるのである。人類はこれまで進化上、風邪など一過性に侵入してくる抗原に対しては大量効率のよい免疫防御系を備えるに至ったが、繰り返し侵入してくる抗原をうまく処理できない。ここに自己免疫疾患発症の重要な素地がある。

同様の例は岡林の遅延感作実験にも見られる。すなわち、ウサギなどの実験動物を同一抗原を用いて繰り返し免疫すると、個体の免

図3 抗原による遅延感作と自己免疫疾患 (岡林 篤より)



ウサギを同一抗原で繰り返し免疫し続けると、免疫応答は極期を迎えやがて衰微していくが、この頃に種々の自己免疫病態が生起する。
SLE: 全身性エリナマトーデス

免疫応答は次第に強くなり極期に達し (図3)、免疫グロブリンが過剰に産生されて免疫応答が亢進する。さらに抗原刺激を加え続けると、ある時期を越えて免疫応答が極端に低下する疲弊期を迎える。この時期になると、Mタンパク質や RF など通常にはない異常タンパク質が産生されて、やがて自己免疫疾患が生起する。致死的ではないが繰り返して侵入してくる過剰の抗原に対して、個体は適切に対処できないのである。

こうした事実は、自己免疫疾患に見られるアポトーシスの異常とも関連がある。アポトーシス受容体の1つ Fas または Fas リガンドに異常のある MRL/lpr マウスは、リンパ系過剰増殖を来し自己免疫疾患を発症する。細胞がアポトーシスにより死すべきときに死なないと自己免疫疾患に陥るのは、繰り返す抗原刺激がリンパ系の過剰増殖を来して自己免疫に至る経緯と一致しており、自己免

疫疾患とリンパ系過剰増殖、または自己免疫疾患と抗原刺激によるリンパ系過剰増殖と類似している。

自己免疫疾患の遺伝素因

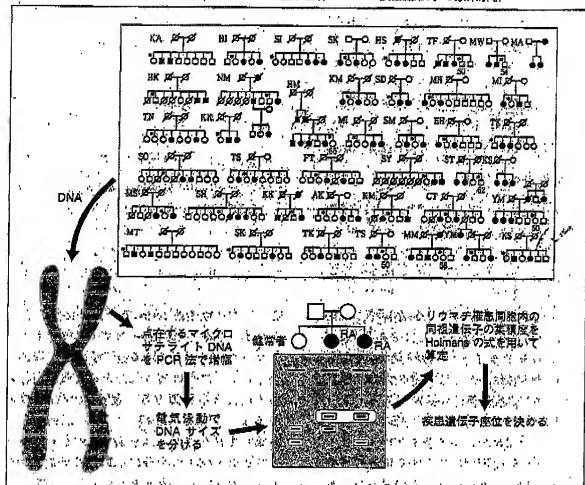
自己免疫疾患は、遺伝素因に環境要因 (引き金) が加わって発症する。従来の研究は、自己免疫疾患が多因子遺伝によることを明らかにしたが、実体は不明であった。自己免疫疾患の遺伝解析が難しいのは、① 候補遺伝子が分からず、検索すべき遺伝子が特定できない、② メンデル遺伝形式が分からない、③ 多因子遺伝であるから浸透率が低く、したがって検出感度が落ちるからで、さらに④ 慢性関節リウマチ (RA) では患者が比較的高齢発症で、診断確定時にすでに両親が死去していて遺伝子型が決定できないという具体的問題点がある。こうした問題にもかかわらず、最近の分子生物学の進歩は、医学を

(2001, 4)

特 集：慢性関節リウマチ-遺伝子異常とその修復-

17 (837)

図4 マイクロサテライトマーカーを標識にした全染色体レベルの疾患遺伝子の家系解析



慢性関節リウマチ (RA) の罹患細胞 2 名以上を含む 41 家系より抽出した DNA を、PCR 法で増幅し電気泳動する。我々は、多数の検体を処理する必要から最高速の ABI377 型 DNA シークエンサーを用いて、1 人から 358 ヲ所のマイクロサテライトマーカーを検定した。PCR: ポリメラーゼ連鎖反応

論理的な学問へと発展させただけでなく古典的遺伝学にも変革をもたらし、家系を対象にした遺伝解析を格段に進歩させた。

1. 多因子遺伝解析上の問題点の克服

上述の問題点に対して、① は全染色体に散在するマイクロサテライトマーカーを指標にすれば、絨毯爆撃によって全染色体が解析できる。② にはメンデル遺伝形式を問わないノンパラメトリックな同胞対検索法 (sib-pair method) が使える。③ は解析法の感度

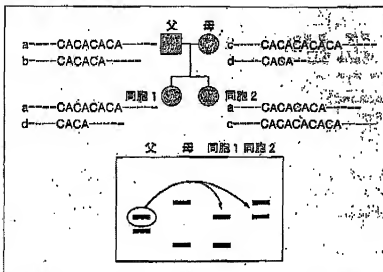
と家系および民族の遺伝的背景に依存する。

④ について我々は、当初遺伝解析プログラムが入手できなかったので、Risch, Holmans の方法にならない、両親が検定できなくても使える遺伝解析のコンピュータープログラムを作成した。

2. マイクロサテライトマーカー解析法

染色体には、マイクロサテライトマーカーと呼ばれる塩基配列が数塩基の単位で繰り返す部分がある。中でも CA の 2 塩基の繰り返

図5 罹患同胞対検索法



両親のマイクロサテライトマーカー DNA のうち、a が罹患同胞に分配されていることが、電気泳動上の増幅 DNA フラグメントのサイズを計測 (サイジング) して分かる。これが同胞遺伝子 IBD (identical by descent) である。もしこの a が1つは父親、他は母親由来であったならば、罹患同胞は a を共有しているが、それは IBD ではなく見かけ上の一致 IBS (identical by state) となる。

返し配列 (CA リピート) が有名で、これは DNA 上約 300~500kb ごとに分布している。マイクロサテライトマーカーを標識に選べば、全染色体にわたって一定の幅で、標識遺伝子の遺伝的受け渡しが追跡できる。

手順は次のとおりである (図4)。各人から抽出した DNA を、各マイクロサテライトマーカーの塩基配列に対応する蛍光標識プライマーを用いて PCR 法で増幅する。これを電気泳動して、増幅したマイクロサテライトマーカーのサイズを決定する (サイジング)。マイクロサテライトマーカーは、CA 塩基の繰り返し配列 (サイズ) が人類間で十分多型性に富み、親子兄弟間でもサイズが異なっている確率が高いことから、マイクロサテライトマーカーのサイズを正確に測れば、親子間でマイクロサテライトマーカーの受け渡しを実際の対立遺伝子と同様に判定できる。測定する検体数が極めて多いため、電気泳動はX線フィルムに焼き付けることなく、蛍光色素をレーザーでスキャンできる DNA シークエンサーを用い、ジーンズスキャンなどの画像解析ソフトを用いて、蛍光画像の位置から遺伝子サイズを決定した。

3. 同胞対検索法 (sib-pair method)

サイジングされた個々のマイクロサテライトマーカー DNA (標識遺伝子) が、家系内でどのように受け渡されたかを古典的同胞対検索法によって調べる (図5)。マイクロサテライトマーカーは核酸の CA 配列が n 個重複して存在し、これを人類集団として見たとき対立遺伝子が十分に多型性に富む (すなわち n が4以上) と判断されることから、同胞対検索法的前提条件を満足する。もし人類集団の持つ対立遺伝子が4つ以下なら、父が a と b、母が c と d の対立遺伝子を持つことから分かるように、両親が同一遺伝子を共有する確率が高くなり、遺伝子の受け渡しが判別できなくなる。

片親由来の遺伝子が患者同胞に等しく分配された場合 (図では a に該当)、これを同胞遺伝子 IBD (identical by descent) と呼ぶ。片親由来の遺伝子が1つ同胞間で共有された場合が IBD=1、2つ共有された場合が IBD=2 である。同胞間で同じ遺伝子が共有されても、片方が母親由来、他方が父親由来であれば、同胞遺伝子 IBD ではない。1つの DNA が分裂して、両方に分配されて初めて同胞と言

(2001.4)

特 集：慢性関節リウマチ-遺伝子異常とその修復-

19 (839)

えるからである。

1つの家系で同胞間の2つの対立遺伝子が互いに独立ならば、同胞がIBDを2つ共有する確率 Z_2 は0.25, 1つ共有する確率 Z_1 は0.50, 共有しない確率 Z_0 は0.25である。罹患同胞対で特定のマイクロサテライトマーカー(標識遺伝子)が疾患遺伝子の近傍にあれば、この値に偏り(Z_2, Z_1, Z_0 の間に χ^2 検定法で有意の偏り)が生じて連鎖が見いだされる。これが同胞対検査法の原理である。この際、遺伝子の授受が同胞、親子、一卵性双生児で計算され、 $Z_0 \geq 0, Z_1 \leq 0.5, Z_2 \geq 2 \times Z_0$ および $Z_0 + Z_1 + Z_2 = 1$ の制限が設定される。この条件下にlog odds (oddとは偏りのこと)すなわちLod値が計算され、 Z を上記の制限下にコンピューター上で動かして、最大のLodすなわちmaximal Lod score (MLS)が算出される。

4. RAの遺伝素因-疾患遺伝子座-

RAの疾患遺伝子を検索した我々の場合、検索の範囲を全染色体にわたって約10cMの幅(精度)になるように358ヵ所のマイクロサテライトマーカー部位を設定した。すべてのマイクロサテライトマーカー部位における遺伝子の授受すなわちIBDを計算して、最終的にMLSが3を超えるマイクロサテライトマーカー部位を連鎖ありとした。ここにLodは、ありやすさ(Likelihood)の帰無仮説からの偏り具合を示す指標で、MLS=3はおよそ1,000倍の「ありやすさ」すなわち確からしさを意味し、 $p=0.001$ の推計値に相当する。

RA家系は、RAが比較的高齢発症であるため、診断確定時に両親の多くが死去していて検索できない。両親の遺伝子型が決まらないうと、罹患同胞が共有するaが片親由来($IBD=1$)か、あるいは片方は父、他方は母由来($IBD=0$)であるかが一義的に決まらな

い。このため我々は、以下のように健常同胞の遺伝子型を考慮することによって、両親の遺伝子型を決定した。

我々は、Lod値が3を超えて有意であった第1染色体、D1S214/D1S253, 第8染色体D8S556, X染色体DXS1232の合計3つの遺伝子座をRAの疾患遺伝子座として、順にRA1, RA2, RA3と命名した(図6)。

慢性関節リウマチ(RA)の疾患遺伝子

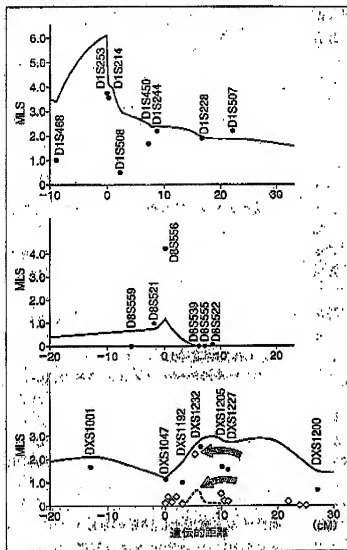
我々は、マイクロサテライトマーカー解析により、RAの疾患遺伝子を含む染色体領域として3ヵ所の遺伝子座を特定したが、最近X染色体の疾患遺伝子を分子レベルで同定することができた。ここに、疾患遺伝子とRAの発症病因の関連について概説する。

1. RAの病変過程

RAは原因不明であるが、病変の発症と進展の様式については大方の合意が得られている。RAの病変過程は3期に分けて考えられる(図7)。第1期には、病原因子が血中より関節滑膜に到達して局所で免疫応答が開始する。第2期には、血中からマクロファージ、リンパ球、好中球などが遊出して慢性炎症が展開する(臨床上是関節の腫脹となる)。第3期には、①炎症滑膜から放出されたプロテアーゼ、②炎症性肉芽組織の延長であるパンプス、あるいは③炎症滑膜によって活性化された軟骨細胞による軟骨基質内部からの消化の3つの過程によって、関節破壊が進行する(臨床上是関節の変形となる)。

関節は、あらゆる抗原が血流に乗って必ずいったんはここを通過する1つの免疫臓器であり、関節の主要構成要素である滑膜表層細胞は抗原提示能を有する特殊な間葉系細胞で、関節に進入した抗原は滑膜細胞によって抗原提示され、抗原提示された活性化T細胞は、強く増殖してサイトカインを分泌する。

図6 慢性関節リウマチ (RA) の疾患遺伝子座位



特定した3ヵ所をより詳細に、近隣のマイクロサテライトマーカーを選んで再検討すると、第1染色体ではD1S214とD1S253の領域にMLSが6を超える有意な遺伝子座位が見いだされた。第8染色体では、同じD8S556にMLSがsingle point analysisで4を超える遺伝子座位が見いだされた。またX染色体では、DXS1232の0.1cM近傍(矢印の位置)にMLSが2を超える有意な遺伝子座位が見いだされた。X染色体はXが父親では必ず伝播されるから、MLS=2をもって有意と判定される。MLS: maximal Lod score

この際、T細胞の近傍に位置する滑膜間葉系細胞が強く活性化されて、以後半ば自動的に滑膜間葉系細胞を主体とした滑膜増殖と関節破壊が進行すると考えられる。

滑膜の間葉系細胞は、関節破壊にかかわるバネスの主要構成成分として直接軟骨・骨を侵食破壊するほか、IL-1、IL-6やTNF α などの炎症性サイトカインを産生して関節破壊を進行させる。こうした滑膜間葉系細胞の半ば自律性の強い増殖機構の原因は不明であるが、サイトカインなどのシグナルが細胞内

に過剰に伝達されて活化された増殖関連遺伝子(NF- κ Bやc-fosなど)が原因の1つとして推定され、実際c-fos遺伝子を滑膜細胞や骨芽細胞に強制発現させると、RA類似の滑膜の過剰増殖や骨粗しょう症が誘導される。

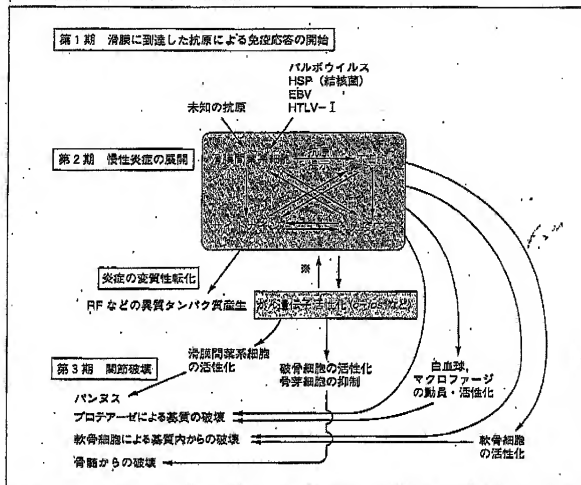
このように、RAは初め抗原特異的に発症するが、慢性炎症の結果RAの関節破壊は抗原非特異的に進行し、好中球やマクロファージを主体にした抗原非特異的な生来性免疫応答(innate immune response)が、RAの病態形成に主要な役割を演じると考えられる。

(2001, 4)

特 集：慢性関節リウマチ—遺伝子異常とその修復—

21 (841)

図7 慢性関節リウマチ (RA) の病因機序



慢性関節リウマチの病変過程。炎症の展開には、滑膜関節系細胞とT細胞が主要な役割を演じる。この結果 α - fas などのがん遺伝子が活性化されて、関節を「場」とする滑膜関節系細胞の増殖・活性化による滑膜肥厚、近傍の骨芽細胞などの活性化による関節破壊が進展する。炎症の遅延化にはがん遺伝子の活性化が重要と考えられるが、このがん遺伝子の活性化はまた滑膜細胞やT細胞の特異的な応答（例えば、DNA の修飾など、半ば腫瘍性の変化）にも影響を及ぼすと考えられる（※印）。

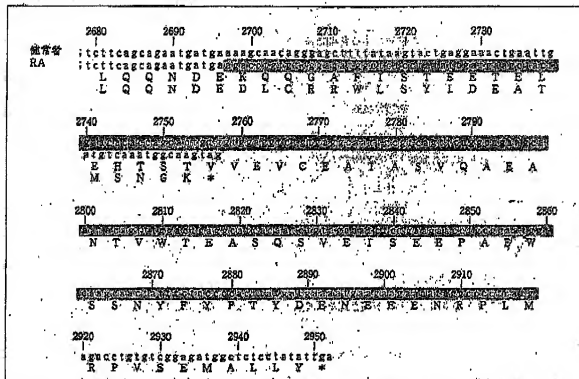
2. RAの疾患遺伝子候補

1) DR3 遺伝子

当研究室の小西良武と我々は、第1染色体の疾患遺伝子 $RA1$ の候補として、Fas ファミリーの一員で、構造的にも Fas 同様細胞外にシステインリピード構造を有し、細胞死を誘導する death receptor 3 (DR3) を同定した (Konishi Y, et al submitted). $RA1$ 遺伝子は、既知の DR3 上における nt564 (A→G); Asp159Gly, nt630+622 (del14),

nt631-538 (C→T), nt631-391 (A→T), nt631-243 (A→G) の1塩基多型 (SNP) 4カ所および核酸欠損1カ所の変異体であった。変異のために転写が早期に終結し、細胞外断片が生成し、断片は正常 DR3 分子と3量体を形成した。このため、下流のカスパーゼ8以下のシグナル伝達が阻害された。変異は多発家系の RA 例で 6/60 (10%)、孤発 RA で 7/297 (2.36%)、健常対照者で 1/266 (0.38%) に認められ、Bayes の定理によると、代表

図8 RAS 遺伝子と *Dbl* がん原遺伝子



X染色体にある慢性関節リウマチ (RA) の疾患遺伝子 *RA3* は、DXS984 に位置する *Dbl* がん原遺伝子の 3' 末端の部分に欠失変異した遺伝子である。塩基番号 2697 番目から 2919 番目までの 223 塩基が欠失していて、2697 塩基以降がコードする 65 アミノ酸が欠損しており、国際表記法で nt2697(del223) と表現される。

略語：巻末の「今月の略語」参照

的4家系で発端者が当該遺伝子によって発症する確率は96%以上と計算された。

抗原特異的免疫応答の過程で、増幅・活性化したリンパ球に適切に細胞死（アポトーシス）が誘導されない而自己免疫疾患に至ることは、疾患モデル MRL/lpr マウスの Fas 変異例からも明らかである。今回見いだされた疾患遺伝子にコードされる DR3 分子は、リンパ系細胞にほぼ限局されて発現する death receptor で、Fas 分子と構造が類似して Fas ファミリーの一員としてとらえられ、このため 3 番目の death receptor という意味から DR3 と命名された。しかし DR3 に関する知見を詳細に検討すると、細胞死シグナルの受容体として、Fas が唯一最重要な分子であるか否かがいまだ明確でなく、同じファ

ミリーの TNFR や DR3 との間の機能的および臓器分布上の住み分けや分業の実体は群からではない。したがって現時点では、比喩を用いれば RA の疾患遺伝子 DR3 が自己免疫疾患発症における Fas 変異のヒト版であると考えることができるが、自己免疫疾患発症における細胞死機構の破綻の重要性に鑑みると、今後この分野における生化学的知見の積み重ねが重要であり、近い将来自己免疫疾患の発症機構の本質的分子機構が明らかになるものと思われる。

2) *Dbl* ががん原遺伝子

当研究室の駒井浩一郎と我々は、X染色体にある疾患遺伝子 *RA3* として、DXS1232 から 0.1cM 近傍の DXS984 に位置する *Dba* がん原遺伝子に変異を見いだした。RA では、

(2001,4)

特 集:慢性関節リウマチー遺伝子異常とその修復-

28 (843)

Dbl 遺伝子の 3' 末端近くの塩基番号 2697 番目から 2919 番目までの 223 塩基が欠失しており、この欠失は第 23 と第 24 のエキソンスキッピングの結果であり、このためオープンリーディングフレームにフレームシフトが生じて、元の Dbl より 65 アミノ酸短い異常ポリペプチド鎖が生成する (図 8)。

Dbl ががん原遺伝子はグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) 活性を有し、rho タンパク質を細胞膜から細胞内の標的タンパク質へ移送するシャトル機能を担うほか、Rac, cdc42 および rho の上流に位置してこれらの活性化をつかさどる。Rac, cdc42 および rho は生理的に好中球など食細胞の膜の動き、食食、移動などを支配し、また Rac は活性酸素生成にかかわる NADPH オキシダーゼの構成成分である。このことから、Dbl は食細胞の動きや食食に関係し、活性酸素生成の鍵を握ると推定される。また Dbl の C 末端は標的脂溶性に富み、あるいは両親水性であり、この部分で rho など G タンパク質の脂質基を抱き込み、これを膜から解離させて標的タンパク質へと移送すると考えられる。したがって C 末端を欠く RA3 遺伝子は、rho など G タンパク質の移送および Rac や cdc42 の活性化を阻害して、好中球機能や食細胞の抗原提示能を障害し、炎症を遅延化させる可能性が考えられる。事実、Dbl 変異のある患者のほぼ全例において活性酸素生成能が有意に低下していることが、当研究室の日笠真理により見いだされた。このように特定の部位にエキソンスキッピングの起きる原因として、1 つは近傍のイントロンに SNP などの塩基置換のあることが知られている。そこでこれを検索してみると、第 22 と第 23 エキソンに挟まれたイントロンに 5'-TTACAGT-3' から 5'-TTATAGT-3' の SNP のある例が見いだされた。この変異のために実際にエキソンスキッピングが生じることは、実験的にエ

キソントラッピング法により確認された。現在のところ、Dbl 変異に起因する好中球機能異常がどのようにして RA を引き起こすかについて十分説明できていないが、古典的な知見によると好中球がないと炎症が終息しないとされており、慢性炎症が終息しないことが病因の重要な部分を占める RA では、このことが特に興味深く思われる。

結 語

これまでは、自己免疫疾患の遺伝素因が多因子遺伝によることが解明されたものの、実態は不明であった。しかしながら、最近の分子生物学の進歩は、医学を臨牀的な学問へと飛躍させただけでなく古典的遺伝学にも変革をもたらし、家系を対象にした遺伝解析を格段に進歩させ、ついに遺伝素因の本体が分子の言葉で語られることになった。今回見いだされた RA の疾患感受性遺伝子は、生理的な細胞増殖と細胞死にかかわる分子であり、その機能異常が自己免疫疾患の遺伝素因を形づけていることが示唆された。また、RA における滑膜の過剰増殖がこのような遺伝素因に基づくことを考え合わせると、本症の治療には増殖抑制を主体にした治療が選択されるべきであると思われる。

参 考 文 献

- Shiozawa S. et al: Identification of the gene that predispose to rheumatoid arthritis. *Int Immunol* 10: 1891-1895, 1998.
- Komai K. et al: Identification of 3'-deletion mutant of Dbl protooncogene as rheumatoid arthritis disease gene RA3. *Arthritis Rheum* 42 (Suppl): s392, 1999.
- Konishi Y. et al: Death receptor 3 (DR3) as a candidate for rheumatoid arthritis disease gene RA1. *Arthritis Rheum* 42 (Suppl): s392, 1999.
- 横沢依一: 現代医学の基礎 第 9 巻 (笹月健彦 編) p101-125. 岩波書店, 東京, 2000.